

ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ В КОНТРОЛЕ ЧИСЛЕННОСТИ ЛЕСНЫХ НАСЕКОМЫХ-ФИЛЛОФАГОВ

Ильиных А.В.

Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск,
avilyinykh@mail.ru

APPLICATION OF THE MODERN APPROACHES FOR CONTROL OF FOREST PHYLLOPHAGOUS INSECTS

Ilyinykh A.V.

It is shown that molecular biology methods can be used for optimization of the biological control of forest phyllophagous insects. A recombinant baculoviruses are received with a comparatively high biological activity, a short latent period and without change of hosts circle. Under further investigations the PCR method can be applied for diagnostics of the outbreak phases of forest phyllophagous insects.

В популяциях лесных насекомых-филлофагов, дающих вспышки массового размножения, распространены болезни, вызываемые энтомопатогенными вирусами, которые имеют большое значение в регуляции численности своих хозяев. Кроме того, в популяциях филлофагов широко представлены латентные вирусные инфекции, способные при определенных условиях перейти в острую форму. Согласно классификации вирусов, вирусы насекомых отнесены к 13 семействам (группам), из которых наиболее полно изучено семейство бакуловирусов (Baculoviridae).

На основе бакуловирусов были разработаны препараты для биологического контроля массовых видов насекомых-фитофагов. Бакуловирусы способны вызывать эпизоотии среди насекомых, в течение относительно длительного времени сохраняться в окружающей среде, а также в латентном виде в организме хозяев. Важно подчеркнуть, что бакуловирусы узкоспецифичны – то есть, имеют ограниченный круг хозяев и способны поражать один или несколько видов и не оказывают влияния на нецелевых членистоногих, позвоночных животных и растения. Однако недостатком препаратов на основе бакуловирусов является сравнительно длительный период от момента применения до гибели насекомых (или прекращения их питания), который может составлять от 4-6 до 14-17 дней. То есть, за этот период насекомые нередко успевают нанести весьма ощутимый ущерб кормовым растениям.

Нестабильность результатов применения препаратов также связана с распространением в популяциях насекомых-фитофагов латентных вирусных инфекций. Например, в некоторых случаях успех проведения защитных мероприятий мог совпадать с активацией скрытой вирусной инфекции в популяциях насекомых. Однако в недалеком прошлом еще не было методов, позволяющих диагностировать латентные инфекции.

Имелись попытки применения различных соединений (суперфосфата, сульфата железа и др.) в качестве активаторов скрытого вируса для контроля численности насекомых в природных популяциях [1]. В США был получен патент на метод применения стильбенового соединения для индукции вирусной репликации у насекомых при защите сельскохозяйственных и лесных культур [4]. Однако результаты применения активаторов не давали устойчивого положительного результата, поскольку, в частности, не были исследованы молекулярно-биологические основы явления латентности бакуловирусов. Поэтому был сделан акцент на выполнение работ, связанных с фундаментальными аспектами биологического контроля численности насекомых-фитофагов.

В частности, прогресс в области секвенирования геномов различных организмов (как прокариот, так и эукариот) привел к получению геномных последовательностей нуклеотидов для целого ряда вирусов насекомых. В настоящее время в базе данных Gene Bank насчитывается 62 бакуловируса, для которых определена полногеномная нуклеотидная последовательность (табл. 1). В их числе вирусы, выделенные из насекомых, которые наносят ущерб лесному хозяйству: непарный шелкопряд *Lymantria dispar* (L.) рыжий сосновый пилильщик *Neodiprion sertifer* (Geoffr.) и другие виды.

Секвенирование геномов бакуловирусов и идентификация фрагментов генома сделало возможным создавать штаммы вирусов с заданными свойствами. В частности, недостаток бакуловирусов, заключавшийся в длительном латентном периоде при заражении насекомых, был преодолен разработкой рекомбинантных штаммов. Для этого в геном бакуловирусов с помощью

генноинженерных методов были встроены гены инсектицидных токсинов, в частности, яда скорпионов и пауков [3]. Введение генов токсинов во многих случаях значительно сокращало “период ожидания” энтомопатогенных препаратов на основе рекомбинантных вирусов при сохранении относительно высокой биологической эффективности и без изменения круга хозяев насекомых [8]. Однако применение этих препаратов существенно ограничивает недоверие общества (которое не лишено оснований) к использованию генетически модифицированных организмов. Хотя в данном случае рекомбинантные бакуловирусы не включаются напрямую в цепи питания, как, например, трансгенные растения, некоторые из которых (или продукты их переработки) непосредственно употребляются в пищу человеком.

Таблица 1. Современная классификация бакуловирусов и количество вирусов, для которых определена полногеномная нуклеотидная последовательность

Группы бакуловирусов	Отряды поражаемых насекомых	Количество вирусов, у которых определена полногеномная нуклеотидная последовательность
Альфабакуловирусы (вирусы ядерного полиэдроза)	Lepidoptera	42
Бетабакуловирусы (вирусы гранулеза)	Lepidoptera	15
Гаммабакуловирусы	Hymenoptera	3
Дельтабакуловирусы	Diptera	1
Неклассифицированные бакуловирусы		1

Было установлено, что вирусная инфекция может влиять на гормональный баланс инфицированных особей. Для ряда бакуловирусов показано наличие экдистероидного UDP-глюкозилтрансферазного гена (*egt*-ген), инактивирующего гормон линьки насекомых. Так, инфицирование гусениц непарного шелкопряда [9] вирусами, содержащими *egt*-ген, приводило к нарушению процессов линьки и аномальному росту насекомых, выражавшемуся в продлении возраста. В настоящее время запатентован ряд бакуловирусов с повышенной вирулентностью и обладающих способностью инактивировать гены, кодирующие процесс линьки насекомых.

Одним из возможных способов преодоления вирусной инфекции может быть апоптотический ответ клеток насекомого. В свою очередь, для некоторых бакуловирусов и их хозяев показано, что в целях предупреждения запрограммированной гибели клеток гены-ингибиторы (*iap*-гены) и ген-супрессор апоптоза (*p35*) могут кодировать каспазы, блокируя пути возникновения апоптоза [7]. Это явление также нашло применение в создании более эффективных бакуловирусных штаммов, содержащих гены-ингибиторы апоптоза.

Барьерную функцию, направленную на защиту насекомых от проникновения патогенов (в том числе вирусов) из полости кишечника в клетки эпителия выполняет перитрофическая мембрана. Однако для ряда бакуловирусов было показано, что последние содержат так называемые энхансины (металлопротеазы) – группу белков, способных разрушать белковый матрикс перитрофической мембраны и способствовать проникновению вируса в клетки, что приводит к усилению инсектицидной активности. Энхансины нашли применение в качестве добавок не только к вирусным [10], но и бактериальным энтомопатогенным препаратам [2].

Априори считалось, что бакуловирусы могут длительное время сохраняться в организме насекомого-хозяина в латентном состоянии. Однако латентность бакуловирусов в течение длительного периода времени во многом оставалась загадочным явлением, поскольку не было ответа на принципиальный вопрос: что является источником скрытого вирусоносительства? Это стало возможным благодаря методу ПЦР (полимеразная цепная реакция), который позволяет диагностировать вирус в минимальных количествах (на уровне единичных копий генов). В настоящее время при исследовании вертикальной передачи бакуловирусов (как в лабораторных, так и в полевых условиях) наряду с ПЦР применяются также рекомбинантные ВЯП с зеленым флуоресцентным геном белка (GFP), чтобы дифференцировать передачу вируса от уже возможно существующей латентной инфекции у насекомых [8]. При выполнении защитных мероприятий с помощью вирусного препарата в популяциях непарного шелкопряда для идентификации причины смертности насекомых применялся рестрикционный анализ вирусной ДНК [1]. Этот метод так-

же позволяет установить причину гибели насекомых: либо от вируса, который был внесен в популяцию, либо смертность особей наступила в результате активации скрытого вируса.

При изучении вертикальной передачи вируса всех исследованных случаях уровень вирусносительства у насекомых был значительно выше, чем частота проявления полиэдроза. То есть, полученные результаты демонстрируют, что наличие вируса у насекомых не означает неизбежной гибели хозяев. Вероятно, вирусная ДНК может полностью или частично утратить свою инфекционность, хотя и выявляться в образцах насекомых. Кроме того, развитие вироза может подавляться механизмами резистентности насекомых к вирусной инфекции. Поэтому актуальным остается вопрос, в течение скольких поколений вирус сохраняет способность к индукции вирусной репликации при вертикальной передаче. Для непарного шелкопряда было продемонстрировано, что скрытый вирус диагностировался во всех исследованных популяциях на территории России, а количество насекомых-вирусоносителей возрастало в динамике вспышки [5, 6]. При этом, как уже отмечалось, уровень вирусносительства был выше, чем смертность насекомых от спонтанного или индуцированного полиэдроза. То есть, в популяциях непарного шелкопряда существует определенный фон вирусносительства, который не приводит к активации скрытого вируса. Вероятно, дальнейшие исследования скрытого вирусносительства у насекомых-фитофагов в природных условиях позволят более целенаправленно применять активаторы скрытого вируса для создания искусственных эпизоотий. Это потенциально весьма перспективное направление, поскольку в данном случае биологический контроль не связан с получением и применением вирусных препаратов.

Другим интересным практическим аспектом применения методов ПЦР может быть диагностика фаз вспышек массового размножения, в частности, дендрофильных насекомых-фитофагов. Идентификация фазы градации численности у этих насекомых важна не только для прогноза развития и затухания вспышки. Так, для некоторых видов насекомых было установлено, что чувствительность личинок к патогенам различной природы в значительной степени может зависеть от фазы вспышки массового размножения [2, 6]. Кроме того, было показано, что биологическая активность вирусных изолятов, выделенных в различные фазы вспышки, может значительно отличаться. Это позволяет оптимизировать отбор высоковирулентных изолятов для наработки энтомопатогенных препаратов на основе бакуловирусов.

Работа выполнялась при частичной финансовой поддержке РФФИ: проект №14-04-00615.

Литература

1. Ильиных А.В., Ульянова Е.Г. Латентность бакуловирусов // Известия РАН. Серия биологическая, 2005, № 5, с. 599-606.
2. Штерншиш М.В. Энтомопатогены – основа биопрепаратов для контроля численности фитофагов. Новосибирск: НГАУ, 2010, 160 с.
3. Agler T. Mothra meets its match. Researches engineer insect-killing viruses // Science News, 1994, № 10, p. 154-155.
4. Black B.C. Potentiation of epizootic viral infections of insects // Patent USA № 5879674, 1999, p. 1-6.
5. Ilyinykh A., Kurenschikov D., Ilyinykh Ph., Imranova E., Polenogova O., Baburin A. Sensitivity of gypsy moth *Lymantria dispar* larvae from geographically removed populations to nucleopolyhedrovirus // SHILAP Revista De Lepidopterologia, 2013, vol. 41, p. 349-356.
6. Ilyinykh A.V., Shternshis M.V., Kuzminov S.V. Exploration into a mechanism of transgenerational transmission of nucleopolyhedrovirus in *Lymantria dispar* L. in Western Siberia // BioControl, 2004, vol. 49, p. 441-454.
7. Manji G.A., Hozar R.R., LaCount D.J., Frisen P.D. Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor P 35 to prevent programmed cell death // Journal of Virology, 1997, vol. 71, p. 4509-4516.
8. Rohrmann G.R. Baculovirus molecular biology, 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1736/>.
9. Slavicek J.M., Hayes-Plasolles N. Strain of gypsy moth virus with enhanceol polyhedra and budded virus production // Patent USA № 5582913, 1999, p. 1-7.
10. Slavicek J.M., Popham H.J.R., Riegel C.I. Deletion of the *Lymantria dispar* multicapsid nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene enhances viralkillingspeed in the last instar of the gypsy moth // Biological Control, 1999, vol. 16, p. 91-103.